

Trabalho de Conclusão de Curso

ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO CORPO ADIPOSEO DA BOCHECHA

Marina de Oliveira Maragno



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Marina de Oliveira Maragno

**ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO
CORPO ADIPOSEO DA BOCHECHA**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ariadne
Cristiane Cabral da Cruz

Florianópolis

2018

Marina de Oliveira Maragno

**ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ISOLADAS DO CORPO
ADIPOSO DA BOCHECHA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de maio de 2018.

Banca Examinadora:



Prof.^a, Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Ricardo Souza Magini,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina



Mé Juan Felipe Dumez Montero,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

*Aos meus pais Luiz Ângelo e Kátia
Adriana, por todo amor e por me
permitirem chegar até aqui. Tudo que sou
devo a vocês!*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho, muito mais do que uma pesquisa com finalidades acadêmicas, simboliza uma grande vitória em minha vida: a conclusão da graduação. Todo teor e importância científicos além de todas as pessoas as quais me ajudaram e me apoiaram por conta deste trabalho estarão para sempre em minha memória e meu coração.

Agradeço a **Deus** e meus **amigos de luz** por sempre me guiarem pelo caminho do bem e nunca me deixarem desistir dos meus objetivos.

A professora **Ariadne Cristiane Cabral da Cruz** pela oportunidade e confiança concedidas a minha e por toda sensibilidade, paciência, carinho e talento para pesquisa, qualidades as quais compartilhou comigo para que eu conseguisse concluir esse trabalho de maneira tão rica.

Aos professores **Sylvio Monteiro Junior, Humberto Cherem, José Nazareno Gil, Marcelo Chain, Ricardo Souza Magini, Nelson Makowiecky, Alfredo Meyer Filho, Eduardo Antunes Bortoluzzi, Renata Gondo, e Liliane Grando**, por me fazerem amar essa profissão, além de serem meus exemplos de conduta profissional e pessoal que levarei da graduação para vida.

Aos meus pais, **Luiz Angelo e Kátia Adriana**, meus amores, sem eles eu nada seria. Á todo apoio, carinho e amor imensuráveis. Por nunca medirem esforços para que eu me desenvolvesse e me tornasse uma pessoa melhor em minha jornada. Por serem minha segurança e meus maiores exemplos.

A minha amada irmã **Maria Luiza** e todos **meus amigos íntimos**, sempre presentes em minha vida, me dando carinho e alegrias inclusive nas fases mais críticas e difíceis da graduação. Com certeza não conseguiria sem a presença forte e amiga de vocês.

Ao amor da minha vida **Stéfano**, dono do meu coração, minha inspiração. Por tonar minha vida mais cheia de sentido e felicidade. Seu amor, paciência e companheirismo me permitem ir sempre além. Minhas vitórias são suas também.

Aos meus avós **Vinícius e Dalva, Saudiles e Maria** por todo amor incentivo e confiança, mas principalmente pelo exemplo de vida e pela forte participação em tudo que sou e me tornei. Vocês são minhas diretrizes.

A minha querida e amada filha **Isabela**, a qual ainda nem5 nasceu e já me impulsiona para tantas realizações. Obrigada por estar comigo nessa reta final da graduação.

A minha amiga e dupla querida **Luana**, por todos os momentos difíceis que passasse ao meu lado e por todas as experiências vividas na graduação.

A todos os amigos e pós-graduandos que a odontologia me apresentou: **Andria, Maynara, Juan, Gaby, Mariane, e Raissa**, vocês me ensinaram e possibilitaram muitas oportunidades.

Aos meus **colegas**, pela maravilhosa convivência diária, por toda ajuda e companheirismo durante nossa formação.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

(Isaac Newton)

RESUMO

As células-tronco mesenquimais originadas de tecido adiposo vêm sendo utilizadas com intuito de regenerar tecido ósseo em diversas abordagens da engenharia tecidual e da regeneração tecidual óssea. A almofada de gordura bucal (BFP) é um tecido normalmente descartado em cirurgias plásticas e contém uma fonte rica e facilmente acessível de células-tronco mesenquimais. O isolamento de células-tronco mesenquimais da BFP já foi citado na literatura, inclusive destacando uma possível capacidade superior deste tecido para regeneração periodontal e de defeitos ósseo alveolares, tendo em vista a proximidade anatômica destas estruturas com a BFP. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da almofada de gordura bucal, resultante de bichectomias, e verificar a viabilidade das mesmas *in vitro*. As células foram adequadamente isoladas da BFP por meio da técnica de digestão enzimática e apresentaram viabilidade celular de 88%. Concluiu-se que a técnica empregada foi adequada para o isolamento das células na BFP.

Palavras-chave ou Descritores: almofada de gordura bucal, células-tronco mesenquimais, bichectomia.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells originating from adipose tissue have been used in order to regenerate the bone tissue in various structures of tissue engineering and tissue regeneration. The buccal fat pad (BFP) is a tissue normally discarded in esthetic surgeries and contains a rich and easily accessible source of mesenchymal stem cells. The isolation of mesenchymal stem cells from BFP has already been mentioned in the literature, including the superior capacity of this tissue for periodontal regeneration and alveolar bone defects, considering the anatomy of the structures with a BFP. Therefore, the purpose of the present study was to isolate mesenchymal stem cells from buccal fat pad from bichectomy and verify the cellular viability *in vitro*. The cells were correctly isolated using enzymatic digestion from BFP and they demonstrated 88% of viability. We concluded the used technique to isolated cells from BFP were adequate.

Keywords: buccal fat pad, mesenchymal stem cells, bichectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sequência cirúrgica da Bichectomia: incisão (1.A), avulsão (1.B) e retirada da almofada de gordura bucal (1.C)

Figura 2- (2.A): BFP após transporte para laboratório, (2.B) porção da BFP livre de membrana e vasos sanguíneos mais evidentes e (2.C) tecido fragmentado pronto para ser transferido para garrafa.

Figura 3- (3.A) garrafa contendo tecido adiposo processado e collagenase. (3.B) garrafa 60 minutos após agitação a 37°C.

Figura 4- (4.A) Adipócitos separados do precipitado após primeira centrifugação diferencial. (4.B): Células presentes no precipitado após inserção do tampão de lise e segunda centrifugação.

Figura 5- Placa de contagem celular com as células misturadas ao azul de tripan sendo inseridas para determinação da viabilidade.

Figura 6- (6.A) Células logo após acondicionamento em garrafa plástica no 1º dia, (6.B) Células no 7º dia de cultivo aderidas à garrafa plástica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Células tronco mesenquimais.....	15
2.2 Células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo.....	15
2.3 Bichectomia: fonte de tecido adiposo.....	16
2.4 BFP-ASCs X SC-ASCs.....	17
2.5 Importância do estudo.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. METODOLOGIA	20
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	27
ANEXO I	32
ANEXO II.....	33

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (MSCs), são células presentes em diversos tecidos do adulto, podendo ser encontradas na medula óssea (SPENCER *et al.*, 2012), tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000), ligamento periodontal, dentes decíduos esfoliados (TARASLIA *et al.*, 2018), entre outros. Estas células apresentam capacidade de se diferenciarem em diversos tecidos, incluindo osso (ALVEZ *et al.*, 2014), tendíneo, cartilagenoso, adiposo, muscular, neurais e epiteliais (TAE *et al.*, 2006), representando assim, uma excelente alternativa para engenharia tecidual.

Em humanos, a retirada destas células-tronco da medula óssea compreende um procedimento de considerável morbidade (NISHIMORI, 2002), além disto, o volume da medula óssea coletado é baixo e altamente limitado, resultando em um baixo rendimento de células isoladas (ZUK *et al.*, 2001). Já as isoladas de tecidos adiposos podem ser facilmente coletadas por métodos mais confortáveis aos pacientes, além de que, frequentemente, o procedimento de coleta representa um procedimento operatório que o indivíduo já iria ser submetido e não visa necessariamente o isolamento de MSCs (BOUGIOUKLI *et al.*, 2017; SCUDERI *et al.*, 2005). O principal método utilizado na coleta de tecido adiposo para fins de medicina regenerativa é a lipoaspiração. Especificamente, a lipoaspiração assistida por sucção (SAL) (SCUDERI *et al.*, 2005). A lipoaspiração já vem sendo realizada há alguns anos, podendo contemplar as seguintes áreas: face, queixo, pescoço, áreas axilares, braços, abdômen, cintura, quadris, nádegas, coxas, joelhos, e tornozelos (SUMRALL, 1987).

Outra técnica que também proporciona coleta de tecido adiposo e que vem se popularizando nos últimos anos é a Bichectomia, que consiste na remoção da almofada de gordura bucal (BFP). Bichat descreveu a BFP, em 1801, como uma massa de gordura bem circunscrita. Além disto, fez a primeira análise histológica desta estrutura anatômica (BICHAT, 1801). De acordo com Kahn, Wolfram&Gabel e Bourjat (2000), a BFP está rodeada por uma cápsula bem definida que dá a aparência de uma massa bem controlada sem funcional importância. Entretanto, na medicina moderna, atribui-se vários significados funcionais e terapêuticos às BFPs. Zhang *et al.* (2002) destacam que as BFP, além de promoverem um preenchimento de espaço, são responsáveis pelo deslizamento dos músculos locais. Terapeuticamente podem ser empregadas em procedimentos plásticos

tratando lipodistrofias e herniações locais (A MATARASSO, 2006), fenilizações (ALTMAN, 2012), defeitos periodontais (HADDAD; RAZZAK; SHALL, 2008) e procedimentos reconstrutivos como comunicações bucosinusais de grande porte (ABAD-GALLEGOS *et al.*, 2011). O tecido adiposo extraído em procedimentos plásticos normalmente é descartado (NIADA *et al.*, 2013), mas atualmente vem recebendo especial atenção por apresentar-se como uma fonte eficiente e promissora de células-tronco mesenquimais (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; BROCCAIOLI *et al.*, 2013).

Em janeiro de 2010 foi publicado o primeiro relato do isolamento de tecido adiposo proveniente de BFP. Farré-Guasch *et al.* (2010) realizaram um estudo *in vitro* onde a fração vascular estromal oriunda do tecido adiposo foi analisada e porcentagens de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) foram detectadas e quantificadas. Além deste, outros estudos observaram que a população de células estaminais compartilha um fenótipo muito semelhante às do tecido adiposo subcutâneo abdominal, possuindo alto potencial de regeneração dos tecidos ósseos e periodontais (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; BROCCAIOLI *et al.*, 2013; SHIRAISHI *et al.*, 2012). Ao final, pode-se definir BFP com uma nova fonte, rica e acessível de ASCs para fins de engenharia de tecido (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010). Visto que a BFP é facilmente acessível à dentistas e cirurgiões de cabeça e pescoço, não causando grandes alterações estéticas, principalmente na parte externa do corpo (BROCCAIOLI *et al.*, 2013; KISHIMOTO *et al.*, 2013), o surgimento desse novo nicho despertou o interesse dos pesquisadores para as particularidades das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da bola de Bichat. Estudos avaliando ASCs humanas e de origem animal isoladas da BFP, comparando-as com as isoladas do tecido adiposo subcutâneo (SC-ASCs) sugeriram que as BFP-ASCs devem ser utilizadas em estudos pré-clínicos de regeneração periodontal e defeitos ósseo alveolares (BROCCAIOLI *et al.*, 2013; HADDAD *et al.*, 2008; NIADA *et al.*, 2013 KISHIMOTO *et al.*, 2013).

Apesar dos estudos comparativos de BFP-ASCs e SC-ASCs demonstrarem interações estáveis das células com tecidos saudáveis e substratos sintéticos, as BFP-ASCs demonstraram melhor interação com tecido ósseo alveolar e ligamento periodontal, se mostrando mais eficientes na produção de colônias. Os estudos levantam a possibilidade do material proveniente da BFP ser coletado em regiões anatômicas mais próximas destes defeitos e por isso apresenta melhores resultados na regeneração de tecidos orais e craniofaciais (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; BROCCAIOLI *et al.*, 2013; NIADA *et al.*, 2013; SHIRAISHI *et al.*, 2012).

Tendo em vista o que foi exposto, o propósito do presente projeto foi isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da almofada de gordura bucal, resultante de bichectomias e verificar a viabilidade das mesmas *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-Tronco Mesenquimais

Essas células residem em diversos tecidos do adulto. Friedenstein, Piatetzky-shapiro e Petrakova (1966) publicaram um dos estudos pioneiros no isolamento e identificação de células-tronco mesenquimais (MSCs). As MSCs podem se diferenciar em células não mesenquimais como células neuronais (TAKAHASHI *et al.*, 2017) (KOPEN *et al.*, 1999) e epiteliais (TAE *et al.*, 2006), além das linhagens mesenquimais como óssea (ALVEZ 2014), tendínea, cartilagenosa, adiposa e muscular (TAE *et al.*, 2006). Sua relativa facilidade de isolamento, combinada com suas capacidades de autorenovação e multipotencialidade (SACCHETTI *et al.*, 2007) fazem das células-tronco mesenquimais uma relevante opção clínica para regeneração de tecidos perdidos em um futuro próximo.

2.2 Células-Tronco Mesenquimais Isoladas de Tecido Adiposo

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs), são células-tronco mesenquimais (MSCs), aderentes em frascos de cultura plásticos e podem ser cultivadas *in vitro*, podendo diferenciarem-se em múltiplas linhagens celulares (BOUGIOUKLI *et al.*, 2017). Na maior parte das vezes, são oriundas de procedimentos estéticos onde o tecido já seria descartado, normalmente lipoaspirações: especificamente, a lipoaspiração assistida por sucção (SAL) (SCUDERI *et al.*, 2013; SUMRALL, 1987). Sendo assim, essas células são coletadas por meio de métodos confortáveis e minimamente invasivos aos pacientes quando comparados às MSCs derivadas da medula óssea, além de resultam em vastas amostras com alto número de células (BOUGIOUKLI *et al.*, 2017) (SCUDERI *et al.*, 2005).

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) foram inicialmente identificadas como MSCs no tecido adiposo em 2001 (ZUK *et al.*, 2001). Neste estudo ZUK *et al.* obtiveram dados que comprovaram que o tecido adiposo lipoaspirado poderia conter uma fração significativa de células, concluindo que a natureza autóloga dessas células-tronco, juntamente com sua multipotencialidade e facilidade de aquisição, pode tornar essas células uma excelente escolha para muitas estratégias de engenharia de tecidos e terapias baseadas em células.

Os estudos subsequentes, na linha de isolamento proveniente do tecido adiposo, vieram confirmar e demonstrar a grande viabilidade *in vitro* e ótima taxa de proliferação das ASCs. Com posterior direcionamento para o alto potencial de ASCs no reparo crânio facial (MARRA; RUBIN, 2012).

2.3 Bichectomia: Fonte de Tecido Adiposo

Nos dias de hoje, a bichectomia como uma cirurgia para fins estéticos onde se retira a porção anterior da bola de Bichat com intuito de remodelagem no contorno facial está tonando-se uma técnica cada vez mais comum. Sua baixa morbidade, rápido transoperatório, tranquilo pós-operatório e satisfação dos pacientes com o resultado obtido fazem desse tipo de cirurgia um procedimento cada vez mais corriqueiro (A MATARASSO, 2006; ALTMAN, 2012). Além dos procedimentos visando a estética, ainda temos a almofada de gordura bucal (BFP) sendo utilizada nos tratamentos de defeitos periodontais (HADDAD; RAZZAK; SHALL, 2008) e procedimentos reconstrutivos como comunicações bucosinusais de grande porte (ABAD-GALLEGOS *et al.*, 2011). Mas, no presente estudo nosso foco está na cirurgia de retirada dessa porção de tecido adiposo encapsulada localizada na bochecha, que, semelhante à lipoaspiração, o material retirado seria descartado.

Farré-Guasch *et al.* (2010) publicaram um dos estudos pioneiros isolando ASCs da BFP. Realizaram um estudo *in vitro* onde a fração vascular estromal oriunda do tecido adiposo foi analisada e porcentagens de células-tronco (ASCs) foram detectadas e quantificadas, demonstrando a capacidade das células de se diferenciar na linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica. Os resultados do estudo deram início a visualização da BFP como uma fonte nova, rica, acessível e promissora de células-tronco mesenquimais oriundas de BFPs para a engenharia de tecidos. Associando à odontologia, temos fácil acessibilidade da Bola de Bichat aos cirurgiões-dentistas. É importante ressaltar que, dentre os principais tecidos que vem tentando-se regenerar na área odontológica associados à BFP-ASCs, estão o tecido ósseo e periodontal. (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; SHIRAISHI *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2008).

Partindo do estudo de Farré-Guasch *et al.* (2010), onde foi demonstrado que a porcentagem de proliferação de BFP-ASCs foi ligeiramente superior à do tecido subcutâneo abdominal, SHIRAISHI *et al.* (2012) concentraram sua pesquisa nas BFP-ASCs e investigaram as

condições adequadas de cultura e proliferação para explorar o potencial osteogênico dessas células. O estudo realizou análises *in vitro* e *in vivo*. Na etapa *in vitro*, as células-tronco mesenquimais foram pré-tratadas com rhBMP-2 e OSR (indutores osteogênicos) e inseridas *in vivo*. Após o transplante, foi possível comprovar a capacidade de regeneração óssea das ASCs-BFP pré-tratadas, em defeitos ósseos (SHIRAIISHI *et al.*, 2012).

2.4 BFP-ASCs X SC-ASCs

BROCCAIOLI *et al.* (2013), a fim de caracterizar uma nova fonte de MSCs, avaliaram ASCs isoladas da BFP, comparando com as isoladas do tecido adiposo subcutâneo (SC-ASCs). O objetivo final do estudo visou utilizar essas células para futura terapia de defeitos periodontais e regeneração óssea. Também foi estudado a capacidade de diferenciação e o crescimento em diferentes substratos. Como os resultados, confirmaram que BFP-ASCs compartilham características de MSCs, por meio de análises de imunofenotipagem e de clonogenicidade, assim com as SC-ASCs. Ambos os tipos celulares se mostraram multipotentes e passíveis de indução à diferenciação, como já havida sido descrito anteriormente na literatura por Farré-Guasch *et al.* (2010). É importante salientar que as BFP-ASCs apresentaram maior potencial proliferativo, comparado com as SC-ASCs. Foram investigados o comportamento de ambos os tipos celulares agregados em estruturas naturais *in vivo* na regeneração do ligamento periodontal e do tecido ósseo. (BROCCAIOLI *et al.*, 2013)

Em meio aos experimentos, BROCCAIOLI *et al.* (2013) chamaram atenção à indicação de que a osteodiferenciação de BFP-ASC é especificamente induzida e suprarregulada pela Amelogenina (MA) - proteína da matriz do esmalte. Além de ser a proteína mais abundante da matriz de esmaltes e a indicada para reparo de defeitos periodontais. A MA favorece formação de novas fibras periodontais e de cimento, criando a pré-condição para a regeneração óssea (TANIMOTO *et al.*, 2012; JINGCHAO *et al.*, 2011). Portanto, o estudo de BROCCAIOLI *et al.* (2013) mostrou efeito sinérgico de MA com outros fatores osteoindutivos, a qual poderia ser mantida *in vivo* onde muitos fatores são liberados, proporcionando resultados muito encorajadores ao isolamento de BFP-ASCs. Possivelmente, tal efeito foi mais evidente para BFP-ASCs do que para SC-ASCs devido sua localização anatômica tornando BFP-ASCs mais propensas para responderem a estímulos secretados da mesma área do corpo.

2.5 Importância do estudo

As células-tronco são componentes centrais da medicina regenerativa, com um enorme potencial de mercado projetado para atingir US \$ 170 bilhões até 2020, conforme relatórios recentes da Grand View Research, Inc. publicados em 2015. Os consumidores desse mercado são geralmente hospitais, laboratórios clínicos, bancos de células-tronco e institutos acadêmicos (VERTES *et al.*, 2015). As células-tronco mesenquimais dominam o mercado atual, uma vez que se originam de tecidos adultos não levantando questões éticas como as de origem embrionária (SOLTER, 1999).

No presente estudo, foi proposto o isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo da almofada de gordura bucal pela fácil aquisição do tecido (MATARASSO, 2006; ALTMAN, 2012), localização da BFP (BROCCAIOLI *et al.*, 2013), fácil acesso pelos dentistas e em decorrência dos resultados promissores que essas células estão tendo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* na regeneração óssea (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; SHIRAISHI *et al.*, 2012) e periodontal (HADDAD *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da almofada de gordura bucal (BFP) e verificar a viabilidade das mesmas *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

1ª Etapa: Isolamento das células da BFP

- Localização dos pacientes e aceitação dos mesmos à submeterem-se ao estudo;
- Coleta e transporte do tecido adiposo proveniente da BFP ao laboratório;
- Realização da digestão enzimática do tecido adiposo coletado;
- Isolamento das células da BFP.

2ª Etapa: Cultivo das células isoladas

- Cultivo das células isoladas por 7 dias *in vitro*.

3ª Etapa: Viabilidade das células isoladas

- Avaliar a viabilidade celular.

4. METODOLOGIA

1ª Etapa: isolamento das células da BFP

O projeto foi encaminhado para análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Posteriormente à aprovação do comitê, foi localizado um paciente na clínica de Pós-graduação do Centro de Estudos e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, o qual necessitaria do procedimento de bichectomia.

No procedimento de bichectomia, o tecido adiposo removido da cavidade bucal é normalmente descartado. Assim, ao selecionar um paciente que necessite de cirurgia de bichectomia, o tecido que foi utilizado no presente trabalho é um tecido que seria descartado. Explicou-se ao paciente os objetivos e etapas da presente pesquisa. Com o consentimento e a opção do paciente por participar do estudo, foi solicitado ao mesmo que autorizasse a utilização do tecido removido para o referido projeto.



Figura 1-Sequência cirúrgica da Bichectomia: (1.A) incisão, (1.B) avulsão e (1.C) retirada da almofada de gordura bucal.

O tecido removido foi acondicionado em um tubo tipo Falcon de 15mL esterilizado contendo 10mL de solução salina de fosfato tamponada (PBS) e 5% de antibióticos e antifúngico (PSA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O mais rápido possível, o tecido foi levado ao Laboratório de Virologia Aplicada e manipulado em uma câmara de

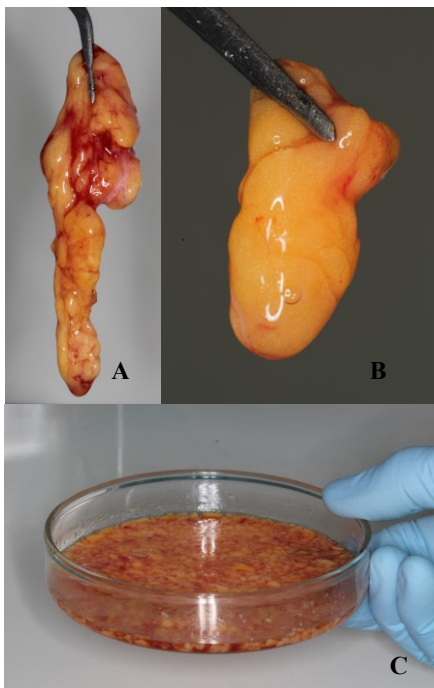


Figura 2-(2.A):BFP após transporte para laboratório, **(2.B):** porção da BFP livre de membrana e vasos sanguíneos mais evidentes e **(2.C)** tecido fragmentado pronto para ser transferido para garrafa.

fluxo laminar em condições assépticas. Com auxílio de pinça e tesoura sobre uma placa de Petri foi retirada a membrana e os vasos sanguíneos visíveis, posteriormente o tecido foi fragmentado. O tecido foi transferido para uma garrafa e lavado cinco vezes com tampão fosfato (PBS) + PSA. Restando somente o tecido adiposo, o mesmo foi digerido com collagenase 1mg/mL (Sigma-Aldrich, USA) por 60 min a 37°C sob

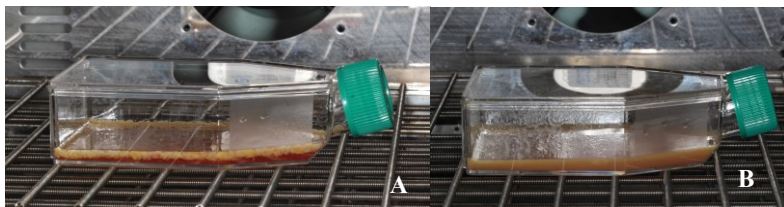


Figura 3- (3.A): garrafa contendo tecido adiposo processado e collagenase. **(3.B):** garrafa 60 minutos após agitação a 37°C.

agitação constante. Posteriormente, foi adicionado meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, realizou-se uma primeira centrifugação diferencial (1500 rpm por 10 minutos) em tubos Falcon de 15 mL. Adipócitos foram aspirados e o precipitado foi mantido. Adicionou-se tampão de lise (NH_4Cl + tris-HCl) para células sanguíneas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após segunda centrifugação diferencial, as células presentes no precipitado foram colocadas em garrafas para cultivo celular de 25cm^2 contendo 5mL de meio de cultivo (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1% PSA. As garrafas foram armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . O crescimento celular no interior das garrafas foi observado com auxílio de um microscópio de fase invertida a cada 24 horas.

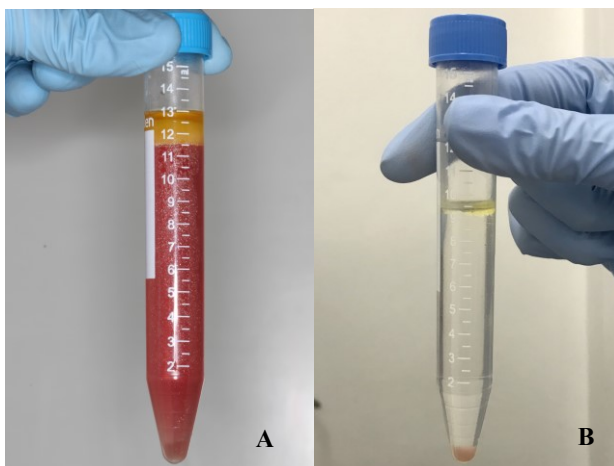


Figura 4- (4.A) Adipócitos separados do precipitado após primeira centrifugação diferencial. (4.B): Células presentes no precipitado após inserção do tampão de lise e segunda centrifugação.

2ª Etapa: Cultivo das células isoladas

O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas. Quando se observou uma confluência de 70%, aproximadamente, as células foram tripsinizadas. Para tanto, cada garrafa foi lavada 3 vezes com 2mL de PBS em cada vez. Posteriormente, foi acrescentado 0,5mL de tripsina que agiu por 5 minutos a 37°C. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 5mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. Cada garrafa da cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1.

3ª Etapa: Viabilidade das células isoladas

A viabilidade das células foi determinada usando o corante azul de tripan pelo contador celular Countes™ Automated Cell Counter (Invitrogen). Determinou-se a quantidade de células viáveis no estabelecimento da linhagem celular.

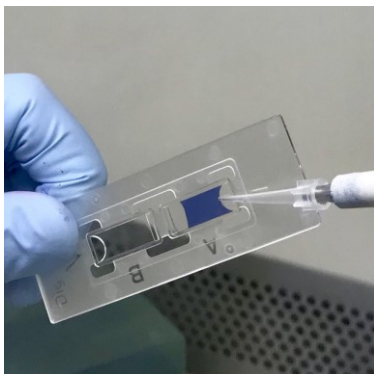


Figura 5- Placa de contagem celular com as células misturadas ao azul de tripan sendo inseridas para determinação da viabilidade.

5. RESULTADO

A técnica de isolamento celular por digestão enzimática utilizando collagenase, descrita na metodologia acima, teve resultado adequado, fornecendo viabilidade celular de 88%.

As células isoladas foram capazes de se aderirem na garrafa de cultura e apresentaram a capacidade de se multiplicar, sendo que em 7 dias após o isolamento, foi realizada a primeira passagem e estabelecimento da linhagem celular.

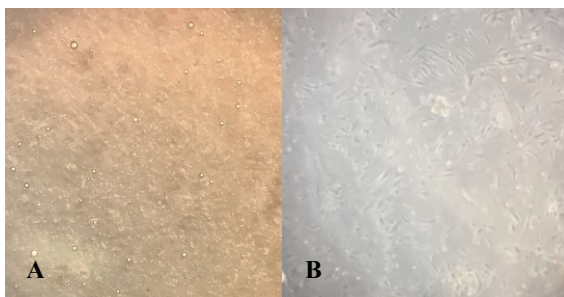


Figura 6- (6.A) Células logo após acondicionamento em garrafa plástica no 1º dia, (6.B) Células no 7º dia de cultivo aderidas à garrafa plástica.

6. DISCUSSÃO

Dentre os principais achados da presente pesquisa estão a comprovação da eficácia metodológica da utilização da técnica de digestão enzimática, empregando-se collagenase, uma vez que as células isoladas provavelmente são células-tronco mesenquimais. Naturalmente são necessários experimentos futuros para comprovar que as células isoladas são realmente células-tronco mesenquimais. Outro aspecto positivo do presente trabalho, é que a viabilidade celular alcançada no momento do estabelecimento da linhagem celular foi de 88%, determinada por meio do emprego do Azul de Tripán. É importante salientar que a viabilidade celular superou a meta imposta pelo estudo de 70%.

Outros estudos na literatura comprovaram que as BFP-ASCs preenchem os quesitos de células-tronco mesenquimais, por meio de testes de imunofenotipagem, clonogenicidade e multipotência, de maneira similar as células SC-ASCs (BROCCAIOLI *et al.*, 2013). O presente trabalho se faz relevante porque a técnica de bichectomia pode ser executada por cirurgiões-dentistas, além do fato da literatura mostrar que o potencial de regeneração óssea craniofacial e periodontal das ASCs é maior para BFP-ASCs, comparado com SC-ASCs (BROCCAIOLI *et al.*, 2013; FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; MARRA; RUBIN, 2012; SHIRAISHI *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2008).

Além dos fatos destacados acima, outro ponto importante do presente estudo é discutir mais uma opção de sítio anatômico para colheita de MSCs adiposas. Convém salientar ainda que a bichectomia é uma cirurgia de mínima morbidade e pouco desconforto para o paciente. Além disso, normalmente o tecido coletado da bichectomia é descartado. Sendo assim, a utilização desse tecido adiposo para isolamento das MSCs representa um aproveitamento dos tecidos (MATARASSO, 2006; ALTMAN, 2012).

Apesar de já existirem estudos não só isolando BFP-ASCs como também testes *in vitro* (BROCCAIOLI *et al.*, 2013) e *in vivo* avaliando essas células (FARRÉ-GUASCH *et al.*, 2010; SHIRAISHI *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2008), há a necessidade de novos estudos avaliando a associação dessas células a arcabouços, bem como a capacidade dessas células associadas com biomateriais se diferenciarem *in vitro* e promoverem a regeneração óssea e periodontal *in vivo*.

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a técnica empregada foi adequada para o isolamento das células na BFP, uma vez que foi possível isolar as mesmas e que a viabilidade celular foi de 88%.

REFERÊNCIAS

A MATARASSO. Managing the buccal fat pad. **Aesthetic Surgery Journal**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.330-336, maio 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.asj.2006.03.009>.

ABAD-GALLEGOS, M. et al. Use of Bichat's buccal fat pad for the sealing of orosinusual communications. A presentation of 8 cases. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, [s.l.], p.215-219, 2011. Medicina Oral, S.L.. <http://dx.doi.org/10.4317/medoral.16.e215>.

ALTMAN, K. Facial feminization surgery: current state of the art. **Int. J. Oral Maxillofacial Surgery**. 41 p. 885-894. 26 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2012.04.024>>. Acesso em: 06 jun. 2012.

ALVES, Endrigo GI et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.190-199, 2 set. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-014-0190-y>.

BICHAT, Marie François Xavier. **Anatomie Generale: Applique a la Physiologie et a la Medecine**. Paris: Brosson Gabon And Cie, 1801.

BOUGIOUKLI, Sofia et al. Gene therapy for bone repair using human cells: superior osteogenic potential of BMP-2 transduced mesenchymal stem cells derived from adipose tissue compared to bone marrow. **Human Gene Therapy**, [s.l.], p.1-1, 6 dez. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.097>.

BROCCA IOLI, Eugenio et al. Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. **BioResearch Open Access**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.107-117, abr. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/biores.2012.0291>.

FARRÉ-GUASCH, Elisabet et al. Buccal Fat Pad, an Oral Access Source of Human Adipose Stem Cells with Potential for Osteochondral Tissue Engineering: An In Vitro Study. **Tissue Engineering Part C: Methods**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.1083-1094, out. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0487>.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal Of Embryology And Experimental Morphology**. [s.i.], p. 381-390. dez. 1966.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 25, p.13625-13630, 21 nov. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.240309797>.

HADDAD, Sally A. El; RAZZAK, Mona Y. Abd El; SHALL, Mohammad El. Use of Pedicled Buccal Fat Pad in Root Coverage of Severe Gingival Recession Defect. **Journal Of Periodontology**, [s.l.], v. 79, n. 7, p.1271-1279, jul. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2008.070176>.

JINGCHAO, Hu et al. Human amelogenin up-regulates osteogenic gene expression in human bone marrow stroma cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 408, n. 3, p.437-441, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.042>.

KAHN, J.I.; WOLFRAM-GABEL, R.; BOURJAT, P.. Anatomy and imaging of the deep fat of the face. **Clinical Anatomy**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.373-382, 2000. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2353\(2000\)13:53.0.co;2-w](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2353(2000)13:53.0.co;2-w).

KISHIMOTO, Naotaka et al. The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. **Clinical Oral Investigations**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.1893-1901, 21 dez. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-013-1166-1>.

KOPEN, Gene C.; PROCKOP, Darwin J.; PHINNEY, Donald G.. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and

they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, [s.i.], v. 96, n. 19, p.10711-10716, 14 set. 1999.

MARRA, Kacey G.; RUBIN, J. Peter. The potential of adipose-derived stem cells in craniofacial repair and regeneration. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, [s.i.], v. 96, n. 1, p.95-97, mar. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.21001>.

NIADA, Stefania et al. Porcine adipose-derived stem cells from buccal fat pad and subcutaneous adipose tissue for future preclinical studies in oral surgery. **Stem Cell Research & Therapy**, [s.i.], v. 4, n. 6, p.148-159, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/scrt359>.

NISHIMORI, M.. Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan. **Blood**, [s.i.], v. 99, n. 6, p.1995-2001, 15 mar. 2002. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v99.6.1995>.

SACCHETTI, Benedetto et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, [s.i.], v. 131, n. 2, p.324-336, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>.

SCUDERI, Nicolò et al. Human Adipose-Derived Stromal Cells for Cell-Based Therapies in the Treatment of Systemic Sclerosis. **Cell Transplantation**, [s.i.], v. 22, n. 5, p.779-795, maio 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3727/096368912x639017>.

SCUDERI, Nicolò et al. Power-Assisted Lipoplasty Versus Traditional Suction-Assisted Lipoplasty: Comparative Evaluation and Analysis of Output. **Aesthetic Plastic Surgery**, [s.i.], v. 29, n. 1, p.49-52, jan. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00266-004-0003-y>.

SHIRAISHI, T. et al. Formation of Engineered Bone with Adipose Stromal Cells from Buccal Fat Pad. **Journal Of Dental Research**, [s.i.], v. 91, n. 6, p.592-597, 26 abr. 2012. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034512445633>.

SOLTER, D.. BIOMEDICINE: Enhanced. **Science**, [s.l.], v. 283, n. 5407, p.1468-1470, 5 mar. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5407.1468>.

SPENCER, Nakia D. et al. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 191, n. 2, p.231-239, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.030>.

SUMRALL, Arthur J.. A Review of Liposuction as a Cosmetic Surgical Procedure. **National Medical Association**. Indianapolis, p. 1275-1279. dez. 1987.

TAE, Suk-kee et al. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomedical Materials**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.63-71, 26 abr. 2006. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/1/2/003>.

TAKAHASHI, Haruka; ISHIKAWA, Hiroshi; TANAKA, Akira. Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. **Human Cell**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.60-71, 16 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-017-0160-3>.

TANIMOTO, K. et al. Amelogenin Enhances the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. **Cells Tissues Organs**, [s.l.], v. 196, n. 5, p.411-419, 2012. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000335912>.

TARASLIA, Vasiliki et al. A High-Resolution Proteomic Landscaping of Primary Human Dental Stem Cells: Identification of SHED- and PDLSC-Specific Biomarkers. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.158, 5 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19010158>.

VERTES, Alain A. et al. **Stem Cells in Regenerative Medicine**: Science, Regulation and Business Strategies. [s.i.]: Wiley-blackwell, 2015. 776 p.

ZHANG, Hai-ming et al. Anatomical structure of the buccal fat pad and its clinical adaptations. *Plastic And Reconstructive Surgery*. [s. L.], p. 2509-2518. jun. 2002.

ZUK, Patricia A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.211-228, abr. 2001. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/107632701300062859>.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 15 dias do mês de maio de 2018, às 9:30 horas,
em sessão pública no (a) CEPID desta Universidade, na presença da

Banca Examinadora presidida pelo Professor
Euadme Bastiane Cabral da Cruz

e pelos examinadores:

1 - Ricardo de Souza Magini


2 - Fuon Felipe Dumez Monteiro

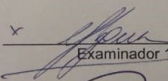
o aluno Marina de Oliveira Maragno

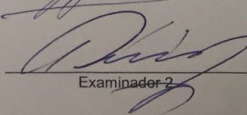
apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

"Indicamento de selulose trieno mirenquimais isoladas de
atmosfera de gordura bucal"

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela liberação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.


Presidente da Banca Examinadora

x 
Examinador 1


Examinador 2

Marina de Oliveira Maragno
Aluno

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento de células-tronco mesenquimais do corpo adiposo da bochecha

Pesquisador: ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82941618.2.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.646.562

Apresentação do Projeto:

Trabalho de conclusão de curso de Marina de Oliveira Maragno sob orientação de Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, do curso de graduação em Odontologia. Estudo prospectivo, com 10 participantes. Critérios de inclusão: Pacientes que serão submetidos a bichectomia com idade superior a dezoito anos. Critérios de exclusão: Não constam. Intervenções: coleta de tecido adiposo removido da cavidade oral e coleta de dados clínicos como idade do paciente, gênero, uso de medicação e condição sistêmica

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da almofada de gordura bucal (BFP) e verificar a viabilidade e proliferação das mesmas in vitro.

Objetivo Secundário: 1ª Etapa: Isolamento das células da BFP, 2ª Etapa: Cultivo das células isoladas, 3ª Etapa: Viabilidade e Proliferação das células isoladas, 4ª Etapa: Armazenamento das células isoladas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Análise adequada de riscos e benefícios.

Riscos: Esta pesquisa não envolve risco nem desconforto físicos ADICIONAIS, uma vez que a necessidade de cirurgia foi previamente determinada. Caso o(a) senhor(a) sinta algum desconforto, pedimos que use a medicação que foi prescrita pelo cirurgião-dentista que realizou o

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.045-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.645.562

procedimento de biópsia e nos comunique para que possamos ouvi-lo. Garantimos que será mantida a confidencialidade das informações e o anonimato das mesmas. Portanto, o seu nome não será mencionado nas publicações em eventos científicos e/ou artigos que surjam após o fim da pesquisa. Entretanto, existe o risco de quebra de sigilo involuntário e não intencional.

Benefícios: os pacientes não receberão nenhum benefício adicional imediato. O benefício será gerado para a comunidade em geral, tendo em vista que trará elucidações sobre a presença de células-tronco mesenquimais na almofada gordurosa bucal e o comportamento das mesmas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável e pelo Chefe em exercício do Departamento de Odontologia. Declaração do Pró-Reitor de Pesquisa em Exercício Professor Albertazzi Gonçalves Júnior, autorizando-a nos termos da resolução 466/12. Cronograma, informando que a coleta de dados se dará a partir da aprovação no CEP/SH. Orçamento, informando que as despesas serão custeadas pelos pesquisadores. TCLE para os participantes, foi adequando para atender as exigências da resolução 466/12.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_1065521.pdf	17/04/2018 10:42:39		Aceito
Outros	Resposta_Comite_Declaracao_Pendent e.docx	17/04/2018 10:41:21	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.docx	17/04/2018 10:40:30	ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLOREANÓPOLIS
Telefones: (48)3721-6394 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.648.582

Folha de Rosto	declaracao_comite_etica.pdf	06/02/2018 10:56:54	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_de_pesquisa_isolamento_MSC. docx	19/01/2018 15:37:12	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
Investigador			DA CRUZ	
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Pro_Reitor_Pesquisa.pdf	19/01/2018 15:35:26	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
			DA CRUZ	

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CPNEP:

Não

FLORIANÓPOLIS, 09 de Maio de 2018

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: csp.propesq@contato.ufsc.br